

Studies on self-incompatibility in *Brassica campestris* L. (*Brassica campestris* L.における自家不和合成の研究)

著者	盧 一燮
号	436
発行年	1991
URL	http://hdl.handle.net/10097/17048

氏 名(本籍)	ノウ 廬	イル 一	ソップ 燮
学 位 の 種 類	博 士 (農 学)		
学 位 記 番 号	農 博 第 4 3 6 号		
学位授与年月日	平 成 4 年 3 月 27 日		
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当		
研 究 科 専 攻	東北大学大学院農学研究科 (博士課程) 農 学 専 攻		
学 位 論 文 題 目	Studies on self-incompatibility in <i>Brassica campestris</i> L. (<i>Brassica campestris</i> L. における自家不和合性の研究)		
論 文 審 査 委 員 (主 査)	教 授	日 向 康 吉	
	教 授	斎 藤 隆	
	教 授	亀 谷 壽 昭	

論文内容要旨

諸言

自家不和合性とは、雄性および雌性器官の構造と機能が正常でありながら、雌ずいに自分の花粉を受粉したときに、自家受精が抑制される機構である。アブラナ科植物の自家不和合性は孢子体型遺伝様式の1遺伝子座のS複対立遺伝子 (S^1 , S^2 , S^3 , ... S^n) によって支配されている。S 遺伝子と共に遺伝するS糖タンパク質が自・他の認識反応に関与していると考えられ、これに関する遺伝子がクローニングされている。しかしこれらは一部のS 遺伝子について検討されており、その全貌は明らかになっていない。

S 遺伝子が複対立遺伝子系となっていることを考慮すれば、多数のS 遺伝子の集団内における存在状態を明らかにし、そのS糖タンパク質とS糖タンパク質遺伝子の変異性を調べるのが自家不和合性の理解と利用に必要であると考えた。アブラナ科植物は地中海地方を起源地とし、*Brassica campestris* はカブとして弥生時代の日本に渡来したといわれ、野生に近い状態で小国町に自生している。本研究では、日本の小国町とトルコのバルチェシュメの野生集団を主材料として、その変異を検討した。

まず第一章では、材料とする *B. campestris* の受粉反応を走査型電顕で詳細に観察した。第二章と第三章では日本に自生する小国集団とトルコのバルチェシュメ集団におけるS 遺伝子について調査し、S 遺伝子を単離しながら、S糖タンパク質を分析した。第四章では両集団間におけるS 遺伝子、S糖タンパク質の異同を比較し、またゲノミックDNAについても比較検討した。

第一章 SEM による花粉・柱頭相互作用の経時的観察

他家受粉30分後、三つの発芽溝(Furrow)をもつ花粉(Fig. 1-a)は一つの発芽溝から分泌物を分泌しはじめ(Fig. 1-b)、1時間後には周りの乳頭細胞を覆った(Fig. 1-c)。この際、花粉管が発芽するが、2時間後まで多量の分泌物が分泌され乳頭細胞はもちろん花粉自身も分泌物に覆われて、花粉管の行動ははっきりは見えない。自家受粉の場合には、大部分の花粉が1時間後には吸水して分泌物を分泌したが、他家受粉に比べると分泌物の量もはるかに少なく(Fig. 1-d)、2時間後には短い花粉管も見えたがその数は少なかった。6時間後には、自・他受粉ともに分泌物は乾き、花粉管が鮮明に見えた。

24時間後の観察では、他家受粉の時には一つの乳頭細胞に一本の花粉管が滑らかに侵入しているものが大部分であったが、二本の花粉管が突出したものも稀に見えた(Fig. 2-a)。自家受粉の場合は、花粉管が乳頭細胞に侵入できなくて、乳頭細胞上を伸びた(Fig. 2-b)。粘着テープを用いて花粉を剥す実験から、自家受粉の花粉管も乳頭細胞と緊密に接していることが分かった。

(Fig. 2-c)。また、自家受粉の場合、花粉は乳頭細胞と接しなくても発芽し、花粉管が別の花粉上で伸長することも認められた(Fig. 2-d)。

以上のことから、自家不和合性においては、花粉の吸水と発芽を阻害する局面と、花粉管の侵入を阻害する局面の両局面で認識反応が起きていること、花粉管侵入阻害が自家不和合性を示す最もよい指標となることを指摘した。

第二章 日本、小国町自然集団における S 遺伝子および S 糖タンパク質の変異

小国町集団の 58 個体を供試し、強い自家不和合性を示す 32 個体の自殖種子を播種し、各系統（同一親由来）内で二面交配を実施する一方、S 糖タンパク質抗体の交差反応を用いて S 糖タンパク質を検出し、S 遺伝子型を決めた。S 遺伝子の分離比を調べた結果、1 系統では分離が認められず、もう 1 系統では和合性を含む複雑な分離をした。残りの 30 系統の S 遺伝子の分離比は全て 1:2:1 の仮説で説明できた。S 遺伝子間の優劣関係が認められたのは、花粉側で 4 例 (13%)、柱頭側で 1 例 (3%) であった。S 遺伝子ホモ接合体間の相反交配を行って、35 の S 遺伝子は 16 の異なる S 遺伝子から成り立っていることが分かった (Table 1)。このことから推定すると本集団には 20 ~ 30 の S 遺伝子が含まれていた。

IEF-イムノブロット法により、62 S 遺伝子中 54 S 遺伝子で S 糖タンパク質が検出できた。S 糖タンパク質には主バンドと副次的バンドが見られた。花粉管侵入から判断された同一 S 遺伝子は、S 糖タンパク質の主バンドの pI 価も同じであった。なお、pI 価の異なる S 遺伝子がヘテロの時に特異的に出現するバンドが存在する例もあった (Fig. 3)。

異なる 16 S 遺伝子の S 糖タンパク質の pI 価は 5.0-9.0 まで変異しており、7.0-9.0 のものが最も多かった。また、SDS-PAGE-イムノブロット分析で分子量を推定すると、50-60KD であった。

なお、これら S ホモ接合体について、柱頭タンパク質の分析を Con A-peroxidase 染色法、クマジブルー染色法、銀染色法を用いて検討し、イムノブロット法の有効性を示した。

第三章 トルコ、バルチェシュメの野生集団における S 遺伝子、S 糖タンパク質およびゲノミック RFLP 分析

第二章と同様の手法を用いて、バルチェシュメから採種した 88 個体の植物を調査し、そのうち 25 系統の自殖種子を展開し、S 遺伝子の分析を行っ

た。25系統のうち、優劣関係が認められたのは花粉側で6系統(24%)、柱頭側で5系統(20%)であった。S遺伝子の分離比を χ^2 分析結果、3系統が期待値から外れていた。イムノブロット分析によってS糖タンパク質を調べた結果、50個のS遺伝子中、検出できなかったS遺伝子は9個(18%)であった。系統内二面交配とイムノブロット分析により35Sホモ接合体が得られた。これらのホモ系統間の相反交配を行って、異なる18個のS遺伝子を同定し、集団内のS遺伝子数を30~35と推定した。Table 2にはバルチェシュメと小国集団のパラメーターの比較を示した。バルチェシュメ集団のS遺伝子構成は小国集団と比較的似ているが、変異の幅が広いことを明らかにした。

IEF-イムノブロット分析から、それぞれのS遺伝子に対応するS糖タンパク質を同定し、主バンドは異なるpI値をもつことを確かめた(Fig. 4)。そして、主バンドの分子量も副次的バンドの分子量もほぼ同じであることを示した。 S^2 -SLG-cDNAプローブを用い、異なる6S遺伝子ホモ接合体間のゲノミックDNAのRFLPのパターンを調べたところ、対応するDNAも異なっていた。

第四章 日本とトルコ両集団におけるS遺伝子、S糖タンパク質および関連RFLPについての比較

小国集団の22S遺伝子、トルコ集団の16S遺伝子、合計38S遺伝子を材料にし、総当たり二面交配を行い、29の独立したS遺伝子を単離した(Table 3)。そのうち、4S遺伝子は両集団に共通していたので、このことから *B. campestris* には100~200のS遺伝子があるものと推定した。

38Sホモ接合体のS糖タンパク質についてIEF-イムノブロット分析を行った結果、由来した集団に関係なく、主S糖タンパク質のpIの値は、同じS遺伝子の場合には同じであった。

本実験で単離した29のS遺伝子について、S糖タンパク質の主バンドのpI値の順により S^{21} から S^{49} まで番号を付けた(Fig. 5)。その中で主バンドのpI値が類似しているグループが三つあった。pI値の似ているS遺伝子間の異同を調べるため、そのS遺伝子間でゲノミックDNAのRFLPパターンを比較した結果、別々のS遺伝子であることを確認した(Fig. 6)。なお、これらのS遺伝子間には同じ分子サイズをもつバンドが複数あって、お互いに相同性の高いDNAの配列を持っていることが推察された。両集団由来の15S遺伝子についてゲノミックDNAのRFLPパターンを分析した結果、各S遺伝子間でそれぞれ多様性を示した。

結語

本研究では、起源地と伝播地の *B. campestris* 野生集団を材料として用い、S 遺伝子の保持と変異についての基礎データを得た。まず第 1 に、*B. campestris* には 100 を越す S 複対立遺伝子が存在することを示し、トルコと日本の集団では、共有されている S 遺伝子が少ないことを明らかにした。S 遺伝子は、ランダムドリフトによって集団から除かれ、それぞれに隔離した集団では、多様な S 遺伝子が保持・蓄積されていることが実証された。

第 2 に、S 遺伝子は S 糖タンパク質によって特徴付けられることを指摘した。この事実は、自家不和合性の反応に S 糖タンパク質が深く関わっていることを改めて示している。

第 3 に、本研究では、花粉と柱頭間の認識反応には、花粉の吸水・発芽と花粉間侵入の両局面があることを指摘した。

最後に、約 30 の変異に富む S ホモ接合体を育成したことを強調したい。これらの S 系統から S 糖タンパク質遺伝子やそれと関連する遺伝子を取り出し、遺伝子導入の材料として利用することが出来るだろう。本研究で抗 S 糖タンパク質抗体と cDNA プローブを利用して特徴づけた S 遺伝子は今後の研究や育種の有力な武器となると期待できる。

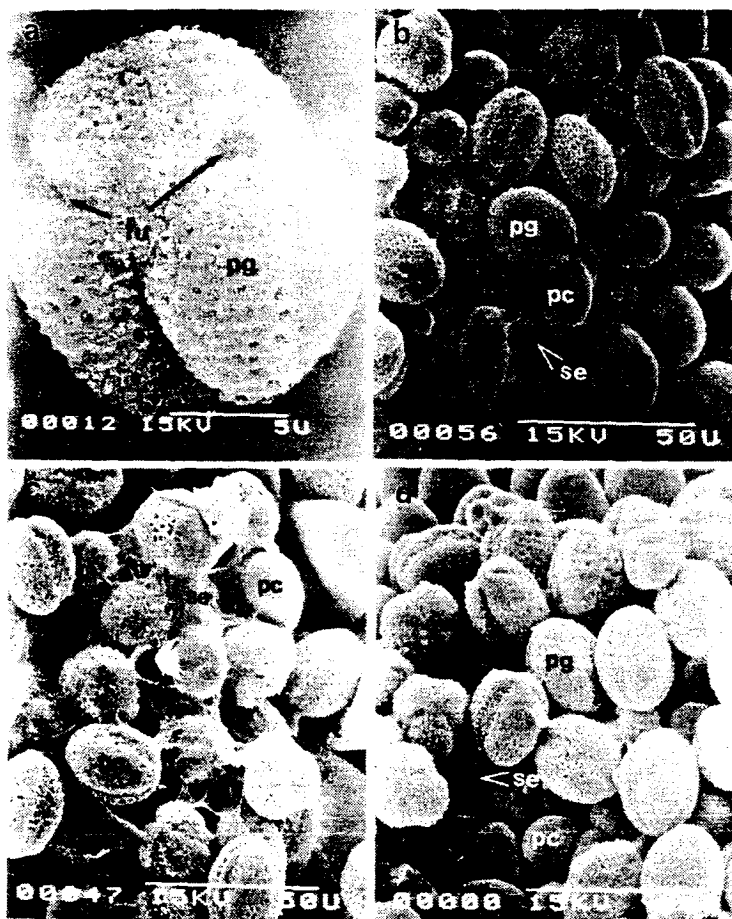


Fig. 1-a. Unpollinated mature pollen grain that showing the three furrows.

Fig. 1-b. The pollen grains on the stigmatic papilla cells 30 min after compatible pollination. A little substances were secreted.

Fig. 1-c. The pollen grains on the stigmatic papilla cells 1 hr after compatible pollination.

Fig. 1-d. At 1 hr after incompatible pollination. Though secretions were visible, the amount of the secretion was conspicuously lesser as compared with those of compatible pollination.

fu; furrow, pg; pollen grain, pc; papilla cell, se; secretion, pt; pollen tube.

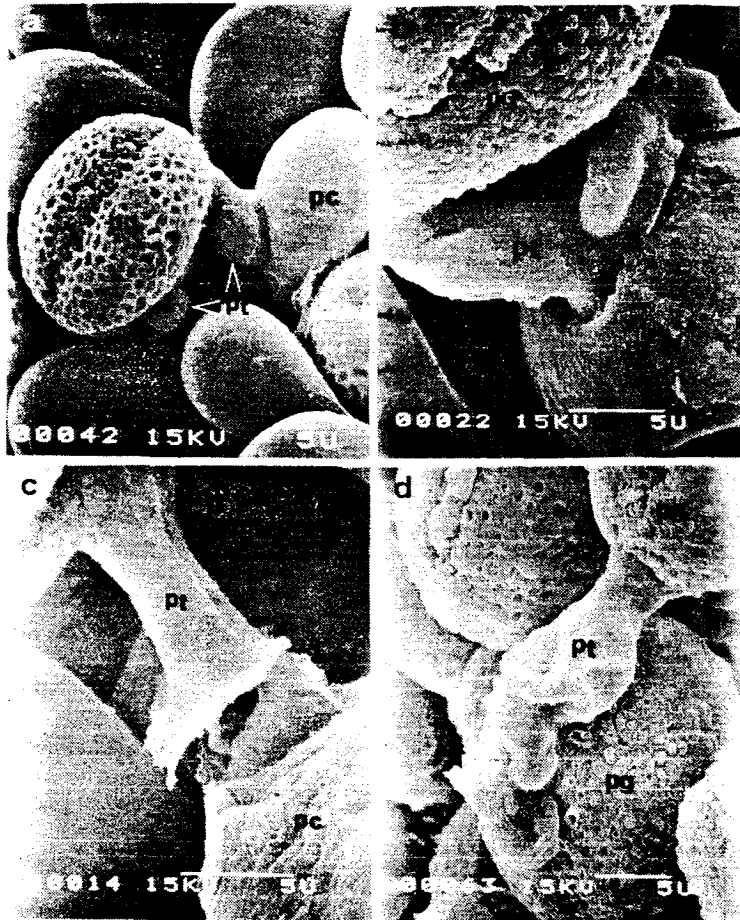


Fig. 2-a. At 24 hr after compatible pollination. The most pollen tubes smoothly penetrated into papilla cells. A pollen grain with two pollen tubes was very rarely observed.

Fig. 2-b. At 24 hr after incompatible pollination. A pollen tube which seems to have penetrated cuticle layer once, crawls along the surface of papilla cell because of inhibition of penetration.

Fig. 2-c. At 6 hr after incompatible pollination. When the pollen tube was lifted with a piece of cellophane adhesive tape after fixation of incompatible pollinated stigma, some materials of papilla cell seems to be lifted with the tube, indicating hard binding between pollen tube and papilla cells.

Fig. 2-d. At 24 hr after incompatible pollination. A case which the pollen tube grew over another pollen grain. pg; pollen grain, pt; pollen tube, pc; papilla cell.

Table 1. Results of diallel pollination between 35 S-homozygotes indicating that they are composed of 16 different S-alleles

Male	7	9	21	33	38	51	1	57	7	38	9	42	11	12	1	19	37	2	25	44	12	36	39	23	51	54	17	18	44	58	11	19	23	25	49
Female	5	1	14	5	7	6	1	13	6	14	7	6	1	6	2	7	1	10	5	2	8	9	3	5	6	7	13	6	5	12	5	11	9	8	
7	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
21	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
33	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
38	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
51	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
57	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
7	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
38	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
9	14	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
12	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
1	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
19	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
37	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
2	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
44	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
12	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
36	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
39	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
23	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
51	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
54	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
17	7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
18	13	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
44	6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
53	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
11	12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
19	15	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
23	11	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
25	9	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
49	8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

+ : More than 20 pollen tubes penetrating, + -: 5-20 pollen tubes penetrating, - : Less than 5 or no pollen tubes penetrating.

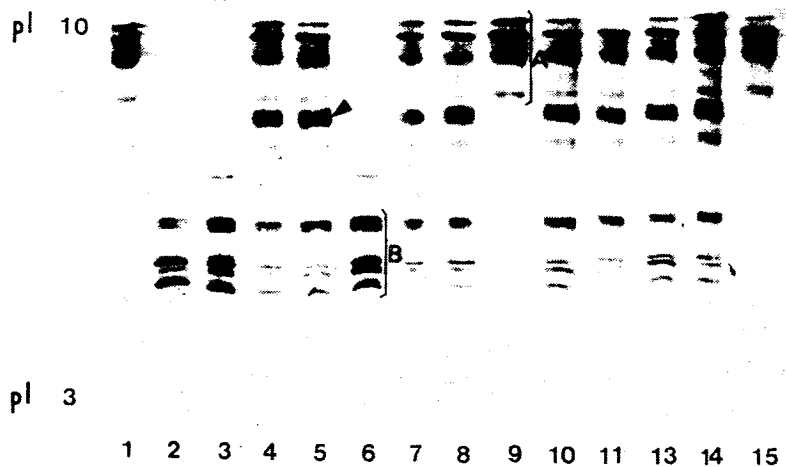


Fig. 3. IEF-immunoblot profile of stigma proteins of each plant in family no. 2, showing that a specific band (arrowhead) appears in the heterozygotes (plant 4, 5, 7, 8, 10, 11, 13 & 14). Plant 1, 9 & 15, and 2, 3 & 6 are two S -homozygotes, $S^a S^a$ and $S^b S^b$, respectively.

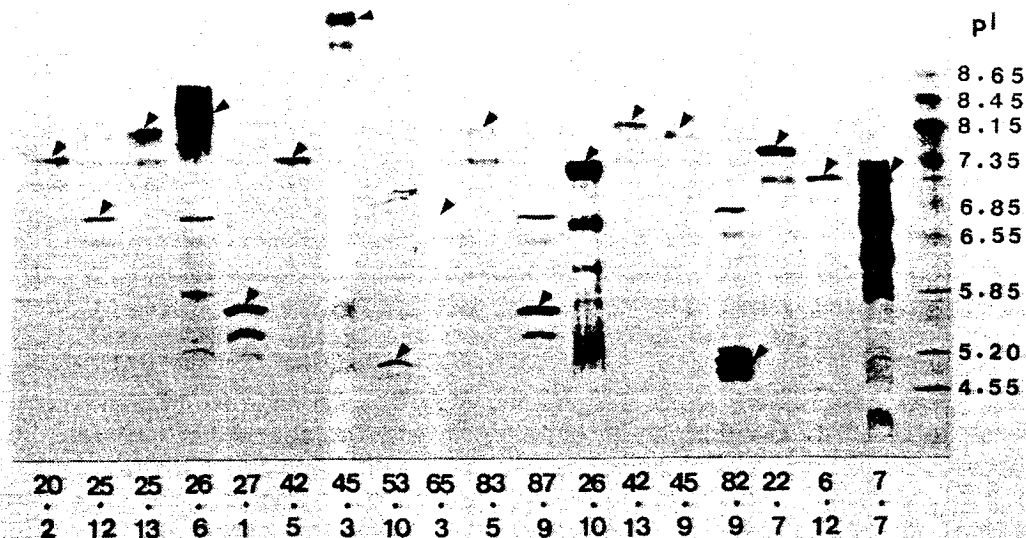


Fig. 4. IEF-immunoblot profile of S-glycoproteins for 18 different S-allele homozygotes isolated from Balcesme, Turkey population. The stigma protein was stained with S^8 -antiserum.

Table 2. Comparison of S-allele identity between S-homozygotes isolated from Oguni, Japan and Balcesme, Turkey populations of Brassica campestris. These two populations have similar features of self-incompatibility gene

		Balcesme	Oguni
Frequency of self-incompatible plants	Self-incompatible p.	83.0%(73/88 plants)	77.6%(45/58 plants)
	Intermediate p.	12.5%(11/88 plants)	8.6%(5/58 plants)
	Self-compatible p.	4.5%(4/88 plants)	13.8%(8/58 plants)
Dominance relationships	Pollen	24.0%(6/25 families)	13.3%(4/30 families)
	Stigma	20.0%(5/25 families)	3.3%(1/30 families)
Deviation of <u>S</u> -allele segregation ratio	1:2:1 ratio		
	at 5% level	12.0%(3/25 families)	0.0%(0/30 families)
Distribution of <u>S</u> -allele occurrence	1 time	61.10%(11 alleles)	37.50%(6 alleles)
	2 times	22.20%(4 alleles)	25.00%(4 alleles)
	3 times	5.57%(1 allele)	25.00%(4 alleles)
	4 times		6.25%(1 allele)
	5 times		6.25%(1 allele)
	6 times	5.56%(1 allele)	
	7 times	5.56%(1 allele)	
Detection of S-glycoproteins by immunoblots		82.0%(41/50 genotypes)	91.4%(53/58 genotypes)
Distribution of pI range in major S-glycoprotein bands	pI 5.0-5.9	22.20%(4 alleles)	25.00%(4 alleles)
	6.0-6.9	11.10%(2 alleles)	6.25%(1 allele)
	7.0-7.9	33.30%(6 alleles)	37.50%(6 alleles)
	8.0-8.9	33.30%(6 alleles)	31.25%(5 alleles)

pI 10

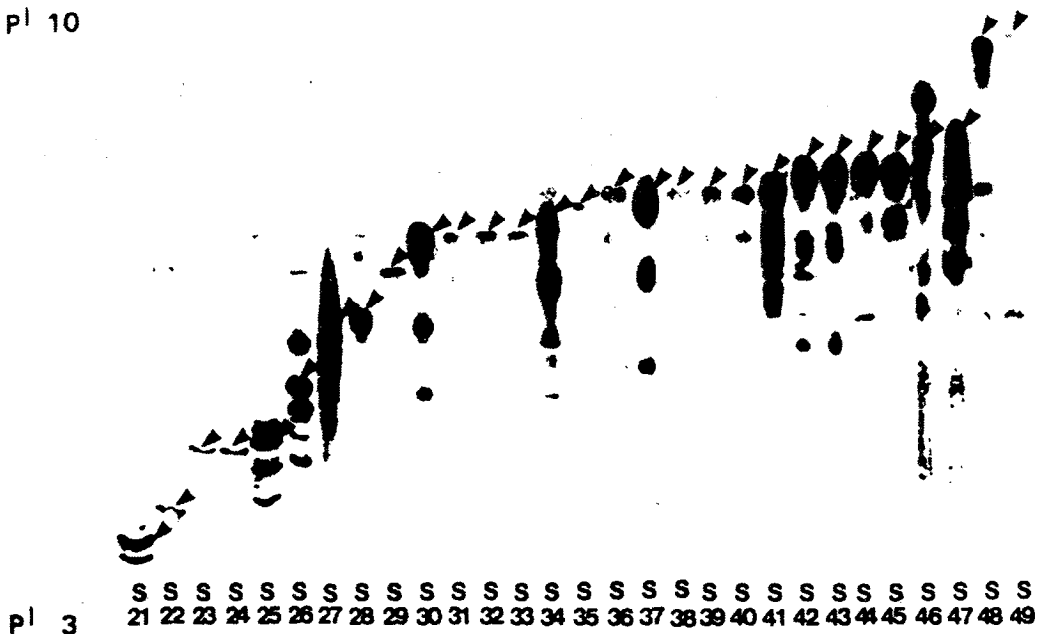


Fig. 5. IEF-immunoblot profile of S-glycoproteins for 29 different S-alleles arranged according to respective pI values. Arrowheads indicate the major S-glycoprotein bands

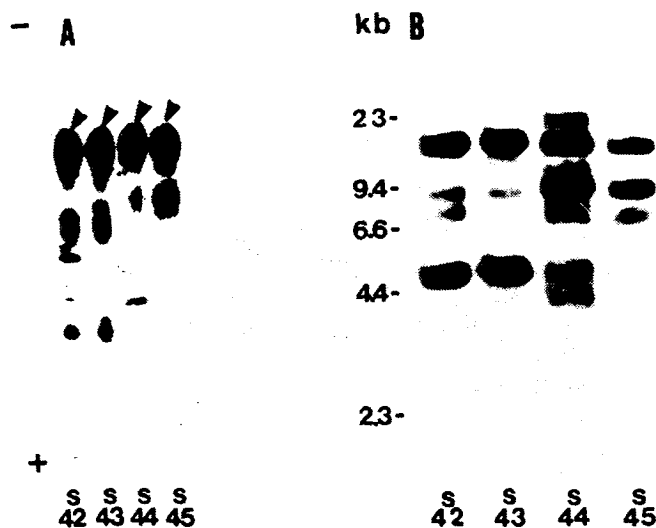


Fig. 6. Protein IEF-gel blot (A) and DNA-gel blot (B) of four different S-allele homozygotes isolated from Oguni, Japan population. Clear differences were observed in DNA-gel blot profile in spite of similar S-glycoprotein profile. IEF-gel blot was stained with S⁸-antiserum and arrowheads indicate the major S-glycoprotein bands. In DNA-gel blot, HindIII-digested DNA was hybridized with S⁸-cDNA probe.

審査結果の要旨

本研究はアブラナ科植物のハクサイやカブの含まれる Brassica campestris を材料として、その自家不和合性について研究したものである。

まず受粉した際の雌蕊と花粉の状態を走査型電子顕微鏡で観察し、他家受粉の場合には、受粉後30分から2時間の間、花粉から多量の分泌物を分泌し、その間に花粉が発芽し、花粉管が柱頭に侵入すること、自家受粉の場合にはその分泌が時間的に遅れ、また量も少ないことを観察し、自・他の認識反応はこの時にすでに生起することを指摘した。さらに花粉管と柱頭乳頭細胞間では、自家受粉の場合にも緊密な物質的接合があるにも関わらず、花粉管が侵入できないので、その間には情報伝達と細胞の応答反応が介在していることを推定した。このような観察はこれまでの受粉反応の観察を一步進めたものである。

さらに本研究では、山形県小国町に自生するカブの集団と、この植物の起源地と思われるトルコの同種野生集団について、自家不和合性に関する各種の特性を調査し、両集団が自家不和合性に関しては基本的には似ているが、トルコのものの方がやや野生的であること、S遺伝子の数は小国集団において20-30、トルコ集団において30-40程度であることを明らかにした。そして、多数のS遺伝子ホモ接合体系統を両集団から単離し、それらの異同を調べた結果、両集団では4個のS遺伝子が同じであることを示し、このことから B. campestris には100を越すS遺伝子があることを明らかにした。また、単離したS遺伝子ホモ系統は30の異なったS遺伝子に分類できること、それらは関連して遺伝するS糖タンパク質の主バンドのpI値によっても特定できることを明らかにし、S糖タンパク質がS遺伝子の働きに密接に関連していることを改めて指摘した。これらの研究結果は自家不和合性について数多くの新発見を加えたものであるし、さらに実際の農業にもまた研究にも利用できる新たなS遺伝子素材を多数提供したものである。

以上の成果は博士学位論文として評価できるものと判断した。